

# 苏芸金杆菌感染粘虫后中肠组织学病变的研究

王 程 沙 槎 云

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

**摘要** 本文描述了 *Bacillus thuringiensis* HD-1 纯晶体感染粘虫 *Mythimna separata* 5 龄初幼虫后, 其中肠肠壁细胞的超微结构变化。电镜观察表明: 首先线粒体发生病变, 随后, 细胞顶部肿胀、胞质电子密度下降, 顶部胞质之下的各种细胞器均受损伤。随着病变加重, 柱状细胞基膜内褶及杯状细胞质突起, 这两个富含线粒体的区域发生病变最为明显。最终, 肠壁细胞解体从基膜脱落。

**关键词** 苏芸金杆菌 粘虫 细胞病理

对于苏芸金杆菌引起的鳞翅目幼虫中肠细胞超微结构的病变, 国外已有一些报道 (Sutter 等, 1967; Ebersold 等, 1977; Endo 等, 1980; Percy 等, 1983; Bai 等, 1984), 但这些研究多在苏芸金杆菌 *Bacillus thuringiensis* (B. t.) 敏感型昆虫上进行, 而 B. t. 对粘虫 *Mythimna separata* 的细胞病理作用未见报道。本文就粘虫取食 B. t. HD-1 纯晶体后中肠肠壁细胞的细胞病理作了较为系统的研究, 现将结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

**1. 晶体的制备** 以实验室所收藏的 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, 用王瑛等 (1980) 方法, 进行液体双相分离与等密度离心分离, 两次分离得到纯晶体。

**2. 昆虫的感染** 供试粘虫 *mythimna separata* Walker 引自中国农科院植保所, 以玉米叶喂养。取刚蜕皮的 5 龄初粘虫幼虫, 饥饿 4—6 小时。上述提纯的 HD-1 晶体用蒸馏水制成 2mg/ml 的致死浓度悬液, 其中含 0.05% 的 Triton X-100, 以其浸润新鲜玉米叶表面, 晾干后喂虫。已取食的幼虫置 28℃ 温箱中培养。对照组饲以含 Triton X-100 0.05% 的蒸馏水浸润晾干的叶子, 其余相同。

**3. 电镜观察** 取不同感染时间的幼虫及正常幼虫, 解剖取出中肠, 在 2.5% 的冷戊二醛中固定 2—4 小时, 剖成矩形小片, 经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 冲洗数次, 投入 1% 锇酸固定液中固定 1—2 小时。固定后的样品经系列酒精脱水, 812 环氧树脂包埋, LKB-IV 型超薄切片机切片, 2% 醋酸双氧铀酒精液染色 30 分钟, 柠檬酸铅复染 15 分钟, 日立 H-600 型电子显微镜观察并拍照, 加速电压为 80KV。

## 结 果

正常幼虫肠壁细胞分为柱状细胞和杯状细胞两种 (图版 I: 1)。

本文于 1988 年 9 月收到。

感染后 0.5 小时, 肠壁细胞线粒体开始轻度凝缩, 而其他细胞结构尚未发生明显变化。感染后 1 小时, 肠壁细胞粗面内质网端池开始轻度肿胀。感染后 4 小时, 肠壁细胞线粒体凝缩加重, 粗面内质网肿胀成球形 (图版 I: 2b)。有些柱状细胞顶部严重肿胀, 微绒毛消失, 呈电子透明状态。顶部胞质中的细胞器病变严重, 粗面内质网断裂, 线粒体的嵴减少或消失, 许多线粒体中间穿孔 (图版 I: 3)。在这些细胞的中下部, 细胞器的损伤程度比上部为轻, 细胞顶部受损程度不一。在观察中还发现: 柱状细胞基膜内褶皱增大, 内褶中线粒体减少。杯状细胞有部分突起脱落。感染后 10—15 小时, 出现大量的脱落肠壁细胞。细胞质膜部分或全部消失, 胞质呈空泡状, 核染色异常, 细胞器难以辨认 (图版 I: 4)。基膜内褶区空化, 褶中线粒体向顶部移动。一些杯状细胞质突起完全脱落, 胞质中线粒体沿杯腔边缘单一排列 (图版 II: 5)。脱落的胞质突起呈膜性结构, 有些膜性结构中还含有严重凝缩的线粒体 (图版 II: 6)。感染后 24 小时, 大部分细胞解体, 细胞质膜完全消失, 胞质泡化, 其间的线粒体肿胀成球形, 嵴断裂 (图版 II: 8)。细胞核染色异常, 其周围多空泡 (图版 II: 7), 基膜内褶消失 (图版 II: 7)。

## 讨 论

从电镜观察结果, 我们认为:

1. 受感染后, 肠壁细胞中的线粒体最早发生形态变化。随着病变的加重, 线粒体的凝缩程度随之加重。

2. 肠壁细胞顶部受毒素损伤程度不一。在同一个细胞中, 不同微区病变程度也有差异, 病变严重的微区中, 线粒体损伤也严重。

3. 在病变过程中, 核的变化不大, 只有在脱落与解体的细胞中才有明显的变化。

4. 病变后, 基膜内褶之间的空间增大, 基膜内褶中线粒体减少或消失。

5. 杯状细胞的病变, 除与柱状细胞相同外, 还表现为胞质突起的脱落。

Fast 等 (1971) 发现, 家蚕幼虫在取食 *B.t.* 后 10—20 分钟, 肠壁细胞普遍代谢破坏, 而在此时, 肠壁细胞的形态尚未发生明显的病变。这说明形态的病变是代谢破坏的次生效应。

Travers 等 (1976) 用 *B.t.*  $\delta$ -内毒素和 2, 6-二硝基酚分别处理家蚕中肠离体的线粒体, 发现  $\delta$ -内毒素刺激离体线粒体对氧的吸收而抑制 ATP 产生。他认为: 毒素首先对于线粒体是解偶联物, 对于膜的作用是次级的。与 Travers 观点相反, Louloudes 等 (1969) 却认为:  $\delta$ -内毒素直接作用于中肠肠壁细胞膜上, 使细胞膜对离子的通透性发生变化从而导致细胞病变。

在我们的实验中, 也发现线粒体是最早发生病变的细胞器。但是, 从线粒体的病变与细胞膜的病变的相互关系中, 我们认为观察结果更符合细胞膜是 *B. t.* 首先作用位点的假说。这一点在我们的结论 (2) 中已阐明。线粒体是观察到最早病变的细胞器这一事实与细胞膜是毒素首先作用位点的观点并不矛盾。因为, 毒素与膜作用可能不会立即引起膜明显的形态变化 (Fast 等 1971 年的实验证实了这一点), 或者说用我们现有的实验手段, 没有观察到膜外形的变化。我们推测, 毒素以某种方式与细胞膜作用而使膜发生变化。膜的变化导致细胞内离子环境的变化, 从而导致线粒体的变化。然而, 一切正常的代

谢运转均有赖于线粒体提供能量,线粒体的病变使细胞的能量代谢受到抑制,这又进一步影响细胞膜。这样的相互影响,加速了细胞代谢的破坏,导致病变加重。

Sutter 等(1967)发现只用 *B. t.* 纯孢子感染欧洲玉米螟幼虫,则幼虫杯状细胞质突起消失,而仅用纯晶体感染,则无此效应。而在我们的实验中,粘虫肠壁杯状细胞质突起的脱落却是由 *B.t.* HD-1 纯晶体所致。如何解释这一现象,有待更进一步的实验研究。

Anderson 和 Harvey (1966) 对惜古比天蚕蛾幼虫中肠进行了超微结构的研究,提出惜古比天蚕蛾幼虫中肠杯状细胞是  $K^+$  从血腔到肠腔主动运输的结构。在我们的实验中发现,柱状细胞基膜内褶结构区域及杯状细胞质突起结构区域都富含线粒体,而在受感染时,这两个区域又都发生了明显的形态变化,很可能是这两种结构相辅,共同完成对  $K^+$  主动运输的调节。这只是我们的一种推测,有待更多的实验支持。

### 参 考 文 献

- 王瑛等 1980 苏芸金杆菌晶体与芽孢分离的研究。微生物学报 20(3): 285—80
- Anderson, E. et al 1966 Active transport by the *Cecropia* midgut II. Fine structure of the midgut epithelium. *J. Cell. Biol.* 31: 107—34.
- Bai, C. et al 1984 Cytopathology of *Spodoptera littoralis* Boisid midgut epithelium following treatment with  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuni Gent*, 49/3a, 875—884.
- Ebersold, H. R. et al 1977 Changes in the fine structure of the gut epithelium of *Pieris brassicae* induced by the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Bull. Soc. Entomol.* 50: 269—76.
- Endo, Y. et al 1980 Mode of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. *J. Invertebr. Pathol.* 36: 90—103.
- Fast, P. G. et al 1971 The delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* II. On the mode of action. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 135—8.
- Louloudes, S. J. et al 1969 Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxic crystals in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 375—80.
- Percy, J. et al 1983 *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 86—98.
- Sutter, G. R. et al 1967 Histopathology of European-corn-borer larvae treated with *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 90—103.
- Travers, R. S. et al 1976 Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin on isolated Lepidopteran mitochondria. *J. Invertebr. Pathol.* 28: 351—6.

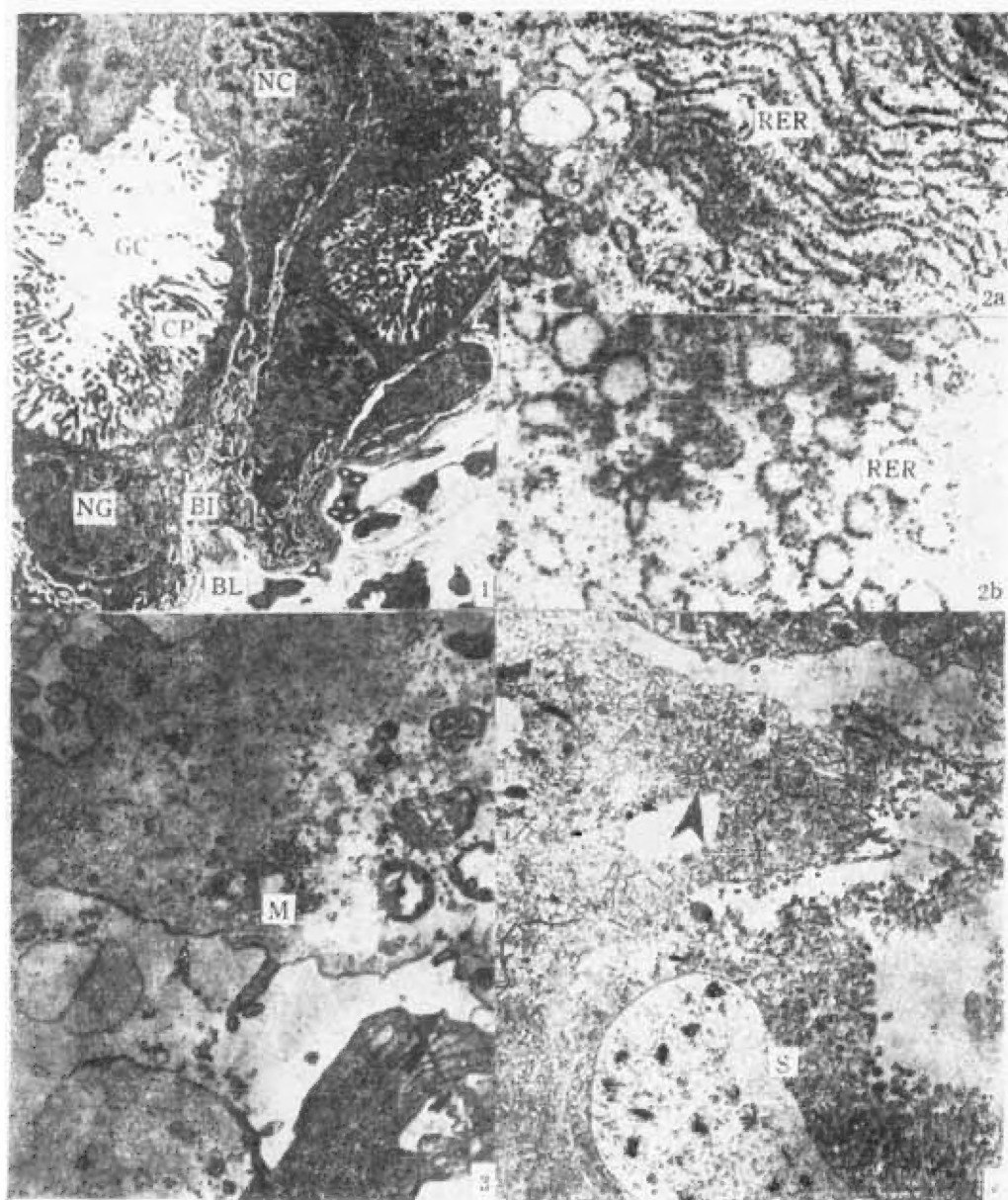
## A STUDY ON ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF THE MIDGUT OF *MYTHIMNA SEPARATA* INFECTED BY *BACILLUS* *THURINGIENSIS*

WANG CHENG    SHA CHA-YUN

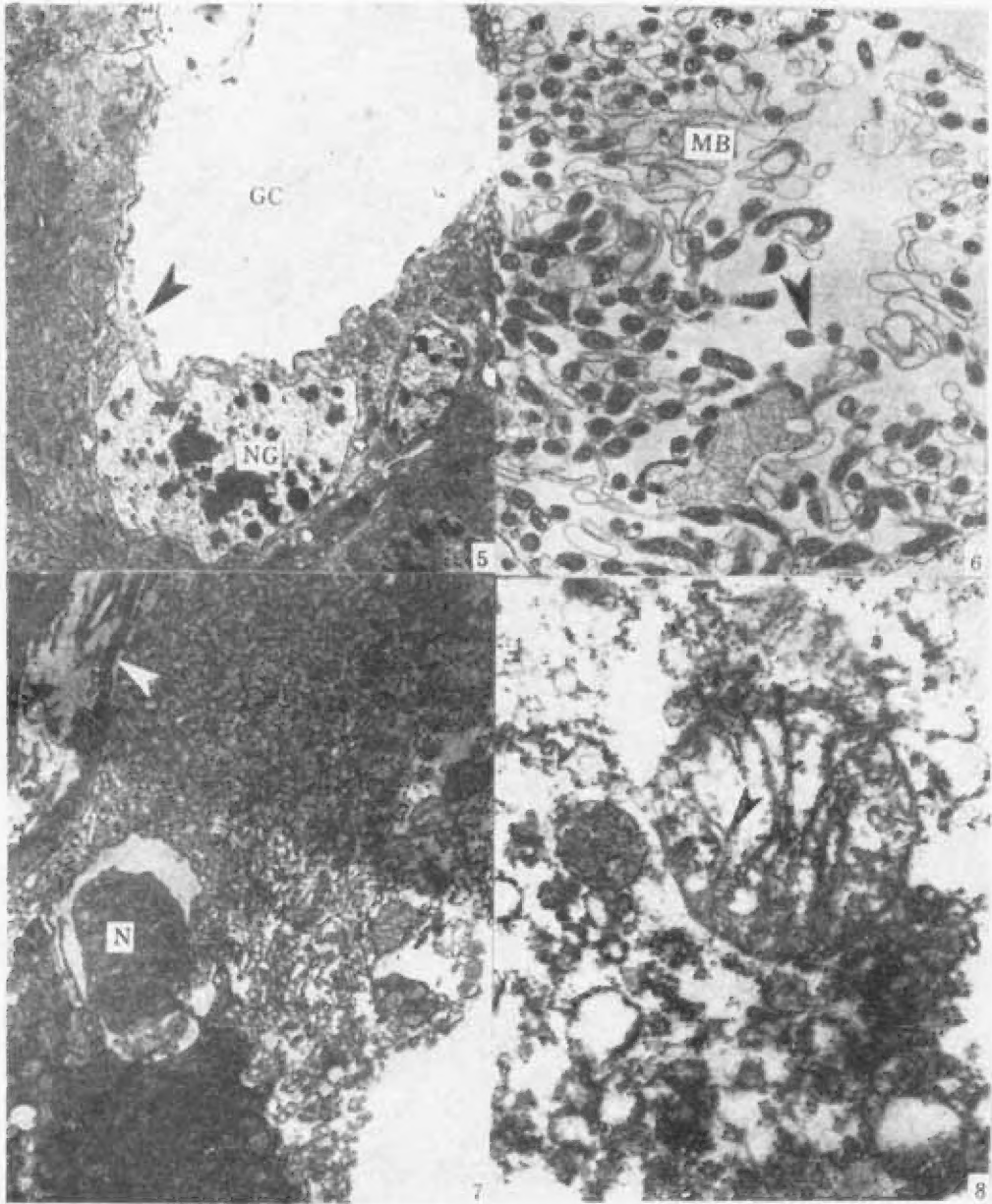
(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)

This paper dealt with the ultrastructural changes of midgut epithelium cells of fifth-instar larvae of *Mythimna separata* following oral administration with  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1). Electron microscopic observation showed that the initial infected organellas were mitochondria. As the pathological process went on, the upper portions of the cells swelled, and cytoplasm in these regions decreased in electronic density and other organelles were damaged to a certain degree. As the infection proceeded still further, pathological changes in the mitochondrial abundant areas of basal membrane infoldings of columnar cells and cytoplasmic projections of goblet cells were obvious. Finally, the midgut epithelium cells disrupted and sloughed off from the basal membrane.

**Key words** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*—*Mythimna separata* Walker—cytopathology



1. 正常粘虫 5 龄初幼虫中肠壁细胞超微结构  $\times 2500$ 。NC: 柱状细胞核, NG: 杯状细胞核, CP: 杯状细胞质突起, GC: 杯状细胞空腔, BL: 基膜, BI: 基膜内褶。2a. 正常幼虫中肠壁细胞粗面内质网平行排列  $\times 30000$ 。RER: 粗面内质网。2b. 感染 4 小时, 幼虫中肠壁细胞粗面内质网肿胀呈球形  $\times 30000$ 。3. 感染 4 小时, 有些柱状细胞顶部肿胀严重, 微绒毛消失(箭头所示), 顶部胞质中线粒体损失严重  $\times 10000$ 。M: 线粒体。4. 感染 10 小时, 脱落的杯状细胞核染色异常, 细胞质膜消失, 脱落的细胞质呈空泡状结构(箭头所示)  $\times 4000$ 。S: 杯状细胞。



5. 感染 10 小时，胞质突起完全脱落的杯状细胞，其空腔胞质中线粒体沿杯腔边缘单一排列（箭头所示） $\times 4000$ 。NG：杯状细胞核，GC：空腔。感染 10 小时，杯状细胞脱落的胞质突起释放出许多膜性结构，有些膜性结构中还含有线粒体（箭头所示） $\times 4000$ 。MB：膜性结构。7. 感染 24 小时，大部分细胞解体，细胞质膜消失，细胞质全部泡化，细胞核染色异常，基周围空洞，基膜内褶消失（箭头所示） $\times 5000$ 。N：细胞核。  
8. 感染 24 小时，解体的细胞中线粒体峭断裂（箭头所示） $\times 30000$